
Barras trifásicas de microextracción líquida para la preconcentración de cobre

Trabajo Fin de Grado

Grado en Química

Curso 2018 - 2019

Realizado por:

Rocío Pardo Carrera

Tutores:

Jose Antonio López López

Carolina Mendiguchía Martínez

Índice

Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1. Metales pesados en el medio ambiente.....	6
1.2. Microextracción en fase líquida	7
1.2.1. Microextracción con gota colgante (Single - drop microextraction, SDME)	8
1.2.2. Microextracción líquido – líquido dispersiva (Dispersive liquid – liquid microextraction, DLLME)	8
1.2.3. Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (Hollow fiber – Liquid phase microextraction, HF – LPME)	9
1.3. Optimización de un método de análisis	11
1.3.1. Técnicas de optimización multivariante simultánea. Diseño de experimentos.....	11
1.3.2. Técnicas de optimización multivariante secuencial. Método Símples.	13
2. Objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Reactivos y disoluciones	15
3.2. Preparación del material.....	15
3.3. Sistema químico	16
3.4. Procedimiento experimental.....	18
3.5. Optimización del método.....	19
3.5.1. Optimización multivariante simultánea.....	20
3.5.2. Optimización multivariante secuencial.....	22
4. Resultados y discusión	23
4.1. Diseño Box- Behnken	24
4.2. Método Símples	32
5. Comparación Box – Behnken y Símples modificado	34
6. Conclusiones	37

7. Bibliografía.....	38
----------------------	----

Resumen

En la actualidad existe una gran preocupación por la presencia potencial de contaminantes químicos en el medio ambiente, como los metales pesados, debido a sus características tóxicas que provocan efectos negativos graves sobre los ecosistemas.

La peligrosidad de estos elementos radica en la persistencia que tienen en el medio debido a que no se pueden degradar, lo que supone que se puedan alcanzar niveles de concentración en los que los organismos vivos no lo toleren y por tanto sean tóxicos incluso a bajas concentraciones.

Debido a la complejidad de las matrices en las que se encuentran los metales pesados y su baja concentración, su análisis presenta una gran dificultad por lo que es necesario llevar a cabo una etapa de preparación de la muestra en la que se separe el analito de la matriz evitando interferencias en la medida y aumentando la señal de la misma.

Recientemente se ha desarrollado la microextracción en fase líquida, un método de separación y preconcentración miniaturizado basado en la extracción líquido – líquido que presenta ventajas con respecto a esta debido a los bajos volúmenes de disolventes orgánicos que se utilizan, generando por tanto una menor contaminación del medio.

En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo entre un método de optimización multivariante secuencial utilizando un *símplex* modificado, y un método de optimización multivariante simultáneo utilizando un diseño de Box - Behnken para un sistema de microextracción en fase líquida utilizando capilares de fibra hueca (HF – LPME). El sistema se ha desarrollado en la modalidad de barras de disolvente para la preconcentración de cobre, obteniéndose valores óptimos de las variables estudiadas. Dichas variables fueron el pH, la concentración del extractante ácido di-(2-etilhexil)fosfórico (DEHPA) y la concentración de HNO_3 como disolución receptora.

Finalmente, se obtuvieron valores de las variables en el óptimo similares para ambos métodos de optimización, por lo es posible afirmar que ambos métodos son válidos para optimizar las variables aunque solo el diseño Box – Behnken proporciona información del comportamiento del sistema químico debido al estudio de las interacciones entre las mismas.

Abstract

At present, there is great concern about the potential presence of chemical contaminants in the environment, such as heavy metals, due to their toxic characteristics that cause serious negative effects on ecosystems.

The danger of these elements is in the persistence that they have in the environment because they can't be degraded. Thus, they can reach concentration levels in which living organisms do not tolerate it. When these levels are exceeded, heavy metals are toxic even at low concentrations.

Due to the complexity of the matrices in which the heavy metals are found and their low concentration, their analysis presents a great difficulty. So, it is necessary to carry out a prior step of preparing the sample in which the analyte is separated from the matrix avoiding interference and increasing the measurement signal.

Recently, a miniaturized separation and preconcentration method based on liquid – liquid extraction, namely liquid phase microextraction has been developed. The main advantage of this method is the low volumes of organic solvents used, thus generating less pollution of the environment.

In this work, a comparative study has been carried out between a sequential multivariate optimization method using a modified simplex, and a simultaneous multivariate optimization method using a Box - Behnken design for a liquid phase microextraction system using hollow fiber (HF - LPME). HF - LPME was used in solvent bar mode for copper preconcentration, obtaining optimal values of the variables studied. These variables were the pH, the concentration of the extractant di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid (DEHPA) and the HNO_3 concentration as the receptor solution.

Finally, similar values of the variables in the optimum were obtained for both optimization methods, so it can be affirmed that both methods are valid to optimize the variables, although only the Box - Behnken design provides information on the behaviour of the chemical system.

1. Introducción

Según la Directiva Marco del Agua de la UE (Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000), se define la contaminación como “la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente” [1].

En la actualidad, la presencia potencial de contaminantes químicos, como compuestos químicos orgánicos e inorgánicos y metales pesados, genera una gran preocupación sobre la seguridad y calidad del agua ya que pueden provocar efectos negativos graves sobre los ecosistemas, siendo los metales pesados los que mayor preocupación generan debido a sus características tóxicas desde un punto de vista ecológico [2 - 4].

1. 1. Metales pesados en el medio ambiente

Los metales pesados se definen como elementos metálicos con una densidad superior a 1 g/mL. La mayoría se pueden considerar además elementos traza debido a su presencia en concentraciones muy bajas en varias matrices ambientales [5], encontrándose en una concentración por debajo del 0,01% [6].

Estos elementos pueden clasificarse en metales traza esenciales o no esenciales, siendo su estudio de gran importancia por las consecuencias que pueden provocar sobre el desarrollo de los organismos, tanto plantas como animales [7]. Metales pesados como el hierro, cobre, zinc, níquel y manganeso se consideran metales esenciales ya que juegan un papel importante en determinadas funciones bioquímicas y fisiológicas de los organismos teniendo efectos peligrosos sobre la salud humana la falta o exceso de los mismos [7].

Los metales no esenciales como el mercurio, cadmio, plomo y cromo son metales tóxicos que pueden causar enfermedades mortales cuando sus concentraciones superan el límite de tolerancia del organismo lo cual ocurre incluso a muy bajas concentraciones [7, 8].

En las últimas décadas, la contaminación por metales pesados se ha convertido en una preocupación mundial y en objeto de estudio, ya que están presentes en los ecosistemas terrestres y acuáticos, suponiendo una grave amenaza para la supervivencia de los componentes bióticos [9]. Asimismo, los metales pesados son unos de los contaminantes ambientales más peligrosos, debido a que no son biodegradables y a su alto potencial de

bioacumulación, persistiendo así en el medio y en los organismos vivos y destacando de esta forma por su toxicidad si se superan los límites de tolerancia de los organismos [2].

Actividades antropogénicas como la minería, la extracción excesiva de agua subterránea, el vertido de aguas industriales no tratadas convenientemente, las actividades agrícolas, etc. contribuyen al aumento de los niveles de metales pesados en los ecosistemas acuáticos, acumulándose en los mismos y afectando a toda la cadena trófica [10,11]. Una de las causas de mayor importancia en el incremento de la toxicidad de un agua por metales pesados es la acidez de las aguas y la forma química en la que se encuentren los metales (especiación) [2,12]. Por ejemplo, la presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos en las aguas resulta en la formación de diferentes especies químicas que afectan a la toxicidad en mayor o menor medida.

El análisis de metales traza en muestras medioambientales presenta una notable dificultad debido a la complejidad de las matrices y a los bajos niveles de concentración en los que se encuentran (niveles de ppm y ppb), especialmente en muestras de agua, por lo que es necesario llevar a cabo la preparación de la muestra con una etapa de separación del metal para evitar interferencias y de preconcentración del mismo para aumentar la señal medida [13 - 15].

En este trabajo, se ha escogido el cobre como metal de estudio debido a que es un elemento esencial, componente crítico funcional de varias enzimas esenciales conocidas como cuproenzimas y que intervienen en la producción de energía, en la formación del tejido conjuntivo, en el metabolismo del hierro, en el sistema nervioso central, en la formación de antioxidantes, en la regulación de la expresión de los genes y en la interacción con nutrientes [16]. Por otra parte, también es un elemento esencial en la hemocianina, proteína presente en crustáceos y moluscos y equivalente a la hemoglobina en animales [17].

1.2. Microextracción en fase líquida

Una de las técnicas convencionales para la preparación de muestras y en concreto, para el aislamiento de analitos, es la extracción líquido – líquido (LLE) [18]. A pesar de ser una técnica muy versátil debido a la capacidad de separar una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos, es un proceso tedioso (debido en parte a la formación de emulsiones) que presenta desventajas importantes como la utilización de grandes volúmenes de disolventes orgánicos que son potencialmente tóxicos y costosos [19 - 21]. Por ello, en los últimos años y con el objetivo de reducir la contaminación medioambiental, se ha trabajado en la miniaturización de los sistemas de extracción surgiendo así la microextracción líquido –

líquido (LPME). De esta forma se consigue la separación de los analitos mediante procedimientos más respetuosos con el medio ambiente ya que se utiliza un menor volumen de disolventes siendo el proceso menos costoso económicamente y más rápido. Además, se obtiene una mayor recuperación del analito a separar y un alto factor de enriquecimiento. Esta técnica ha experimentado una rápida evolución desde los años 90, surgiendo así las siguientes técnicas de microextracción líquido – líquido [22].

1.2.1. Microextracción con gota colgante (Single - drop microextraction, SDME)

Esta técnica consiste en la extracción del analito de interés utilizando como fase extractante una gota de un compuesto orgánico suspendida en el extremo de la aguja de una jeringuilla e inmersa en una muestra acuosa sometida por lo general a agitación constante. Al finalizar la extracción la gota es aspirada e inyectada en el equipo de análisis instrumental correspondiente [6,22].

Con este sistema se logra reducir la manipulación de la muestra, los tiempos de análisis y mejorar los factores de enriquecimiento con respecto a la extracción líquido – líquido. Asimismo presenta una serie de inconvenientes como la baja reproducibilidad del sistema debido a la inestabilidad de la gota colgante al agitar la muestra [6, 22].

1.2.2. Microextracción líquido – líquido dispersiva (Dispersive liquid – liquid microextraction, DLLME)

La microextracción líquido – líquido dispersiva consiste en una técnica de microextracción que se basa en la adición a una muestra acuosa de una mezcla de dos disolventes orgánicos: disolución extractante y agente dispersante. La disolución extractante no será miscible en la fase acuosa, sin embargo el agente dispersante será miscible tanto en la muestra acuosa como en el extractante. Por lo tanto, al inyectar dicha mezcla a la muestra y tras agitación, se formará una emulsión con un gran número de microgotas de fase orgánica dispersadas en la fase acuosa. La alta superficie de contacto entre la muestra y el agente extractante permiten una extracción rápida y eficiente de los analitos. Una vez se ha llevado a cabo la extracción del analito es necesario separar las fases mediante centrifugación para recuperar con una jeringuilla la fase extractante que contiene al analito pudiéndose inyectar directamente en el equipo de análisis instrumental determinado [20, 22].

1.2.3. Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (Hollow fiber – Liquid phase microextraction, HF – LPME)

En la microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca el disolvente orgánico que actúa como extractante impregna los microporos de una membrana polimérica hidrofóbica que separa dos disoluciones: donante (muestra que contiene el analito) y receptora (disolución de destino del analito) quedando así estabilizado el extractante en los poros de la fibra. El extractante actuará como una membrana líquida que queda soportada en los microporos de la fibra siendo por tanto más estable [22].

En este caso, la disolución receptora se encuentra en el lumen de la fibra y la fibra se sumerge en la disolución donante, de manera que los analitos pasarán desde la muestra al interior de la fibra siendo posible su preconcentración al utilizarse volúmenes de fase receptora muy pequeños (μL) en comparación con los de fase donante (mL) [22]. Dependiendo de la naturaleza de la disolución receptora, los sistemas HF – LPME se pueden clasificar en sistemas de dos o tres fases (*Figura 1*).

En los sistemas de dos fases el interior de la fibra se llena con la misma disolución orgánica que impregna los microporos de ésta y la disolución donante es una fase acuosa. De esta forma los analitos se extraen de la disolución acuosa pasando a la fase orgánica alojada en el interior de la fibra. Este sistema se utiliza habitualmente para la extracción de analitos solubles en disoluciones orgánicas inmiscibles con agua permitiendo poder medir los analitos extraídos de forma directa mediante equipos de análisis instrumental que permitan el análisis directo de disoluciones orgánicas [22, 23].

Por otro lado, en los sistemas en tres fases, la fase receptora en el interior de la fibra es una disolución acuosa y los microporos se impregnan con una disolución orgánica que ejerce de extractante. Una vez se sumerge la fibra en la muestra acuosa, los analitos de interés serán extraídos a través de la membrana líquida formada por el extractante hacia la disolución acuosa receptora. En este caso se hacen dos extracciones simultáneas, una donde el analito pasa de la fase donante a la membrana y una reextracción donde el analito pasa de la fase orgánica a la disolución receptora. Este sistema nos permite medir directamente elementos inorgánicos como los metales mediante espectrometría de absorción atómica [23].

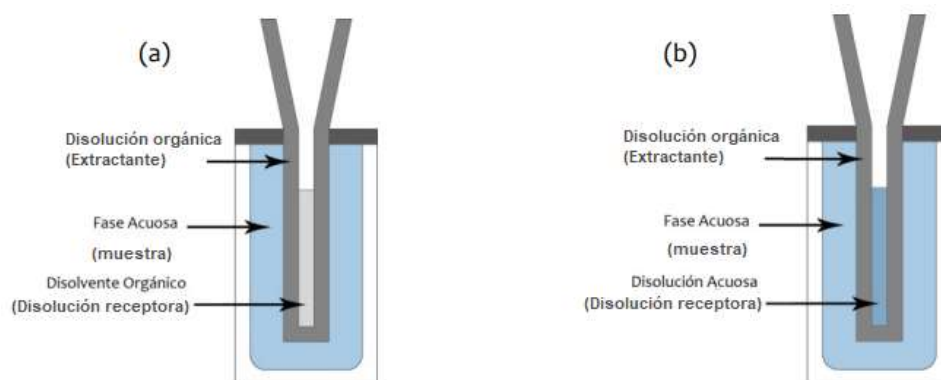


Figura 1: Diagrama esquemático de HF – LPME: (a) configuración de dos fases (b) configuración de tres fases.

Desde un punto de vista medioambiental, la HF – LPME es la mejor opción debido a los bajos volúmenes de disolvente orgánico utilizados para la extracción, además los capilares presentan una gran área superficial que conduce a unos elevados factores de enriquecimiento. Asimismo se obtiene una alta reproducibilidad del sistema debido a que la disolución extractante queda estabilizada en los poros de la membrana polimérica [15].

En esta técnica de microextracción es posible encontrar varios diseños de los sistemas de microextracción siendo uno de los más usados debido a su eficiencia y rapidez la microextracción con barras de disolvente (Solvent bar microextraction, SBME).

En este método de microextracción es posible dejar libre en la muestra el capilar de fibra hueca una vez que ha sido preparado y sellados los dos extremos como se observa en la figura 2. Para recuperar la disolución receptora será necesario cortar uno de los extremos de la fibra [22].

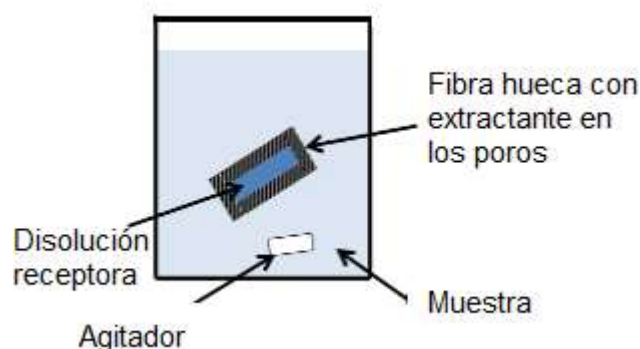


Figura 2: Configuración HF – LPME: microextracción con barra de disolvente (SBME).

1.3. Optimización de un método de análisis

En los métodos analíticos, varios factores pueden influir en la magnitud de la respuesta estudiada. Por lo tanto, cuando se desarrollan métodos analíticos, se requiere la optimización del método mediante la investigación de los factores y sus niveles [24].

Se define "factor" como una variable experimental que puede afectar a la respuesta estudiada y "nivel" a todos los posibles valores que la variable puede tomar. Asimismo se define variable respuesta como la variable objeto de estudio que adopta diferentes valores como resultado de los experimentos [25].

Una estrategia de optimización sencilla que se usa habitualmente para la caracterización de sistemas químicos es la optimización univariante, método consistente en la variación de los niveles de un solo factor manteniendo constantes los niveles de los factores restantes objeto de estudio. La desventaja principal de esta estrategia de optimización es que no puede tomar en consideración las posibles interacciones entre variables. Teniendo en cuenta que las interacciones son muy comunes cuando se desea optimizar un sistema, se utiliza la optimización multivariante. Este método consiste en la variación de los niveles de varios factores al mismo tiempo [26]. Asimismo, basándonos en la forma en la que se realizan los experimentos podemos diferenciar dos tipos: la optimización multivariante simultánea y la optimización multivariante secuencial.

1.3.1. Técnicas de optimización multivariante simultánea. Diseño de experimentos.

La optimización multivariante simultánea aborda técnicas que permiten estudiar la influencia de los factores sobre la respuesta de forma simultánea. De esta forma, se conocen los experimentos totales antes de llevarlos a cabo sin necesidad de evaluar la respuesta de cada uno de ellos previamente [27].

Dentro de esta técnica de optimización, los diseños de experimentos factoriales 2^k y 3^k son de uso generalizado ya que permiten obtener una información completa con un número relativamente pequeño de experimentos. En los diseños 2^k se estudian k factores con dos niveles cada uno resultando un total de 2^k experimentos. En los diseños 3^k la diferencia radica en que el diseño presenta tres niveles para cada factor. De esta forma se definen el nivel alto (+) como aquel en que el valor para la variable es máximo, el nivel bajo (-) como aquel en que el valor para la variable es mínimo y el punto central, como el valor medio entre los valores máximo y mínimo. Aunque la adición de un tercer nivel permite evaluar la curvatura del sistema, el aumento en el número de experimentos generados supone un inconveniente [26].

Como alternativa a estos diseños, cuando al menos dos de los factores son cuantitativos, se puede utilizar la metodología de superficie de respuesta (MSR), la cual permite obtener un modelo matemático que se ajusta a las respuestas experimentales y con el que se puede calcular el nivel óptimo de cada factor. Además, se obtendrá una relación entre la respuesta y las variables de forma gráfica lo que permite determinar las condiciones de operación óptimas del sistema de una forma sencilla [25].

Una variante del diseño factorial 2^k que forma parte de la MSR es el diseño de Box – Behnken. Estos diseños se forman combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos.

El diseño de Box – Behnken es un diseño muy eficiente en cuanto al número de experimentos requeridos lo que se traduce en un menor coste y menor generación de residuos. Además, se trata de un diseño esférico, rotatable y robusto, es decir, que es afectado de forma mínima ante fuentes de variabilidad externas. Todos los puntos del diseño están localizados en una esfera de radio $\sqrt{2}$ inscrita en un cubo centrado en el origen (Figura 3), por lo que no se llevarán a cabo experimentos que queden en los vértices de la región cúbica delimitada por los límites superior e inferior de cada variable, evitándose así que se trabaje dentro de las limitaciones que tenga el sistema [26, 28].

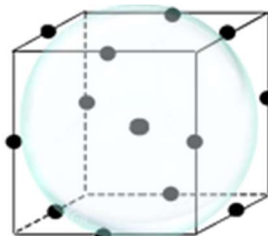


Figura 3: Región experimental para un diseño Box – Behnken con $k=3$ y un punto central.

Esta metodología, además, nos permite estudiar la curvatura del sistema debido a las interacciones cuadráticas obteniéndose un modelo matemático de segundo orden, el cual viene definido por la ecuación 1, y a partir del que se puede obtener la respuesta del sistema en función de las variables y de los efectos de las interacciones.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde y es la variable respuesta, β_i es el coeficiente de los efectos principales, β_{ii} es el coeficiente debido a los efectos cuadráticos, β_{ij} es el coeficiente debido a las interacciones entre los factores i, j ; x representa a cada variable estudiada y ε es un término del error aleatorio [26, 29].

1.3.2. Técnicas de optimización multivariante secuencial. Método Simplex.

Se definen los métodos de optimización multivariante secuencial como aquellos métodos de optimización en los que se utilizan los resultados obtenidos de cada experimento para apoyar las decisiones con respecto a los experimentos que se realizarán más adelante en el proceso que apunta a alcanzar la respuesta óptima. Uno de los métodos más utilizados en este tipo de optimización es el método simplex [24].

En el método simplex la región experimental será una figura geométrica con $k + 1$ vértices y en k dimensiones, definiéndose k como el número de factores estudiados. Es decir, para un caso en el que tengamos dos factores ($k=2$) la figura geométrica que describirá la región experimental tendrá tres vértices y se desarrollará en dos dimensiones, por lo tanto será un triángulo. Para el caso de tres factores ($k=3$) la figura geométrica será un tetraedro, correspondiéndose cada vértice de la figura geométrica con un experimento [26, 30].

El principio del método *simplex* es el desplazamiento de un diseño inicial (*simplex* inicial) a través de la región experimental estudiada para evitar regiones con respuestas indeseables. Una vez se lleva a cabo el *simplex* inicial se evalúan los resultados obtenidos y se elimina el vértice o experimento que tenga la peor respuesta. Como para formar una nueva figura geométrica faltaría un vértice, habrá que realizar un nuevo experimento cuyas condiciones vendrán determinadas por una reflexión del vértice con peor respuesta, generándose un nuevo *simplex* que deberá analizarse nuevamente y desplazarse hacia la región óptima (Figura 4) [24].

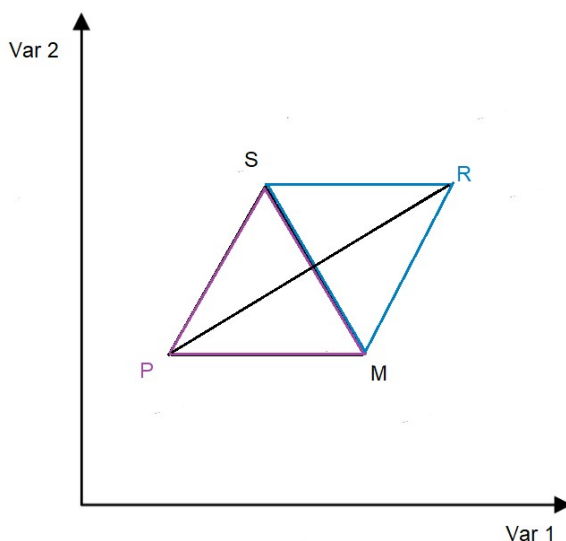


Figura 4: Cálculo de las coordenadas del nuevo vértice, el cual fue obtenido reflejando el punto con peor respuesta (P) para $k=2$.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es optimizar las condiciones químicas para un sistema de preconcentración de cobre basado en un método de microextracción líquida con capilares de fibra hueca (HF – LPME) mediante técnicas de optimización multivariante y decidir cuál de dichas técnicas ha resultado más adecuada para ello.

Para llegar a alcanzar dicho objetivo ha sido necesario el planteamiento de los siguientes objetivos secundarios:

- ✚ Optimizar el sistema de microextracción en fase líquida para el análisis de cobre en agua mediante un método de optimización multivariante simultánea.
- ✚ Optimizar el sistema de microextracción en fase líquida para el análisis de cobre en agua mediante un método de optimización multivariante secuencial.
- ✚ Evaluar cuál es el método de optimización multivariante que permite una mejor optimización del sistema.

3. Materiales y métodos

En este apartado se describen los reactivos, materiales y equipos que han sido necesarios para llevar a cabo el procedimiento experimental, así como el desarrollo seguido para la consecución de los objetivos propuestos.

3.1. Reactivos y disoluciones

Los reactivos utilizados para llevar a cabo el procedimiento experimental fueron: ácido nítrico (HNO_3 , 69%, GlobalChem, (Sevilla, España)), ácido di-(2-etilhexil)fosfórico (DEHPA, 97%, Sigma- Aldrich, (Misuri, EE.UU.)), queroseno (Fluka, (Buchs, Suiza)), ácido acético glacial (CH_3COOH , 100%, Panreac, (Barcelona, España)), acetato de sodio anhidro (CH_3COONa , 100%, Panreac, (Barcelona, España)), hidróxido sódico (NaOH , 98%, Panreac, (Barcelona, España)) y ácido clorhídrico (HCl , 37%, Panreac (Barcelona, España)). Todos los reactivos mencionados anteriormente son de calidad para análisis. También se utilizó agua Milli- Q (Millipore, EE.UU.), la cual es ultrapura (tipo I) y una disolución estándar de cobre de concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$ (SCP Science, (Canadá)).

Para llevar a cabo los experimentos, se prepararon las siguientes disoluciones a partir de los reactivos anteriormente nombrados: disolución receptora de ácido nítrico en agua Milli- Q de concentraciones comprendidas entre 0,05 M y 2 M, disolución orgánica de ácido di-(2-etilhexil)fosfórico (DEHPA) en queroseno de concentraciones comprendidas entre 0,05 M y 2 M. Dicha disolución orgánica es la que impregna los poros de los capilares de fibra hueca actuando de membrana. Se preparó una disolución donante (muestra) de 0,5 mg/ L de cobre y 5 patrones de cobre de concentraciones comprendidas entre 0,1 mg/ L y 2 mg/ L a partir de un patrón de cobre de 100 mg/ L acidificado con ácido nítrico preparado previamente.

Por otra parte también se preparó una disolución reguladora ácido acético/ acetato de sodio de concentración 0,1 M, una disolución de ácido nítrico 2 M y una disolución de hidróxido sódico 3 M para ajustar el pH de la muestra.

3.2. Preparación del material

Debido a que se trabajó con concentraciones de metal muy bajas (niveles de mg/ L), todo el material utilizado (matraces aforados, vasos de precipitado, tubos de polietileno de

baja densidad, etc.) para la realización de los experimentos ha sido previamente lavado con disoluciones ácidas para evitar la contaminación durante el análisis.

En concreto, el protocolo de limpieza consistió en un enjuagado del material con abundante agua del grifo seguido de un posterior lavado con ácido clorhídrico 3 M, el cual se realizó por triplicado. Luego se enjuagó el material al menos cinco veces con agua Milli- Q. Posteriormente se volvió a lavar tres veces con ácido nítrico 3 M y, por último, fue necesario enjuagar al menos cinco veces con agua Milli- Q para eliminar los restos de ácido que pudieran quedar en el material.

3.3. Sistema químico

Para seleccionar el sistema de preconcentración de cobre a optimizar se revisaron principalmente los trabajos previos de investigación del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz relacionados con diferentes sistemas de membranas líquidas de volumen (BLM) y membranas líquidas soportadas (SLM) con el objeto de separar y preconcentrar distintos metales pesados tales como Ag, Ni, Cu, Cd, Fe, etc., presentes en muestras de aguas naturales y aguas de mar. Para ello han utilizado diferentes agentes extractantes como por ejemplo, DEHPA, Cyanex, dPKBH, etc. [13 – 15, 31]. Uno de los extractantes que mejores resultados ha dado para metales divalentes es el ácido di-(2-etilhexil)fosfórico (DEHPA) [15], por lo que se partió de las condiciones químicas óptimas para un método ya desarrollado por el grupo de investigación para la preconcentración y separación de cobre con dicho extractante, haciendo uso de membranas líquidas de volumen (BLM) [14].

En el sistema seleccionado, para que se pueda producir la preconcentración de cobre, es necesario que el metal sea capaz de atravesar la membrana por difusión. Para ello, una disolución orgánica de ácido di-(2-etilhexil)fosfórico (DEHPA) en queroseno actuará de membrana líquida, formándose un complejo neutro entre el metal y el extractante (DEHPA) que propiciará el paso del metal desde la muestra hasta la disolución receptora (ácido nítrico) [14]. A este tipo de transporte se le denomina transporte asistido. En concreto, contratransporte acoplado, ya que el paso de los iones cobre a través de la membrana líquida se ve favorecido por un contratransporte de protones hacia la muestra, es decir, la fuerza impulsora del transporte es el gradiente de protones debido a la diferencia de acidez entre las disoluciones donante y receptora [14]. El proceso que tiene lugar se describe a continuación: el cobre disuelto en la muestra, al llegar por difusión a la interfase muestra -

extractante, forma un complejo neutro con el extractante presente en la disolución orgánica, aportando este dos protones a la muestra. Una vez se alcanza por difusión la interfase extractante - receptora se produce la reacción inversa: la disolución receptora aporta dos protones a la disolución orgánica (que contiene el complejo neutro Cu- DEHPA) debido a que ésta es menos ácida, de forma que el cobre quedará libre dentro del capilar de fibra hueca y el extractante se regenerará de forma que puede seguir extrayendo al metal de la muestra (figura 5) [14].

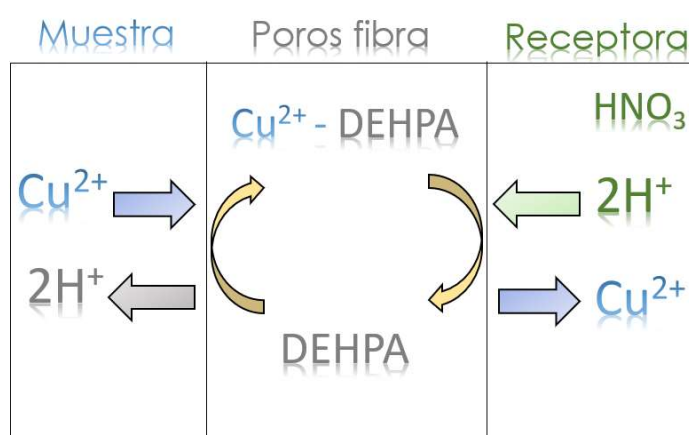
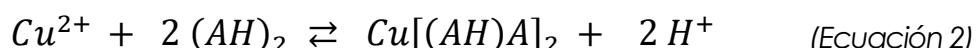


Figura 5: Mecanismo de transporte para el Cu^{2+} con el agente extractante DEHPA.

La reacción química que tiene lugar entre el cobre y el agente extractante es la siguiente:



Donde AH es el agente extractante DEHPA [14].

Atendiendo a la reacción, el DEHPA se encuentra en forma de dímero y aporta dos protones a la muestra, por lo que es necesario añadir una disolución reguladora para evitar que el pH de la muestra cambie durante el transporte del metal.

La finalidad en este caso es la optimización del método con el mismo sistema químico y el uso de membranas líquidas soportadas (SLM). En concreto, se trabajará con capilares de fibra hueca en la modalidad de barras de disolvente con una configuración de tres fases, previéndose un mayor factor de enriquecimiento debido a la mayor área superficial de la membrana líquida [15], y el uso de un menor volumen de reactivos, siendo por tanto un método más “verde” desde el punto de vista medioambiental. Por otro lado, el que se trabaje

con un sistema en tres fases permite medir directamente la disolución receptora (disolución acuosa) mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) con la que una vez se ha preconcentrado el metal.

3.4. Procedimiento experimental

Para el sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca descrito, se realizó un montaje de barras trifásicas donde, como se ha comentado con anterioridad, la disolución receptora fue ácido nítrico y la disolución extractante, una disolución de DEHPA en queroseno. Se trabajó con muestras de cobre de una concentración de 0,5 mg/L a diferentes valores de pH. Debido a la necesidad de controlar la concentración de protones en la muestra, se añadió también a la muestra una disolución reguladora de ácido acético y acetato de sodio con una concentración 0,1 M. El pH fue ajustado con una disolución de hidróxido sódico de concentración 3 M y una disolución de ácido nítrico 2 M siendo medido con un pHmetro (*Basic 20+*, Crison). Para el montaje del sistema se siguió el procedimiento que muestra la figura 6.

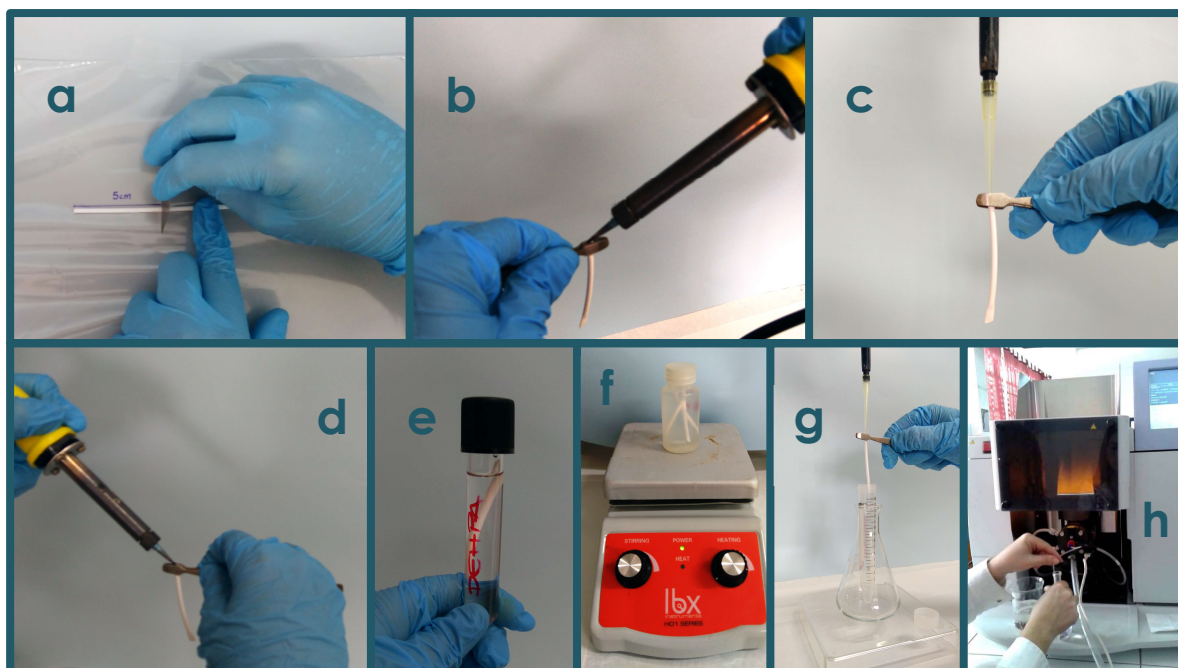


Figura 6: Montaje del sistema de capilares de fibra hueca.

Los capilares de fibra hueca que se han utilizado para realizar los experimentos han sido los capilares *Accurel PP S6/2 (Membrana)*, con un diámetro interno de $1800 \pm 150 \mu\text{m}$ y un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$. En primer lugar, se cortaron los capilares de fibra hueca a una

longitud de 5 cm con la ayuda de una cuchilla (*Figura 6a*), sellándose a continuación por un extremo con un soldador y la ayuda de una pinza (*Figura 6b*). Luego se llenó el interior de la fibra con 100 μL de la disolución receptora utilizando una micropipeta (*Monlab*) (*Figura 6c*). Posteriormente se selló el otro extremo de la fibra (*Figura 6d*) y se introdujo en 10 mL de la disolución extractante durante 30 minutos para la impregnación de los poros (*Figura 6e*). Pasado ese tiempo, se sumergió la fibra en agua Milli-Q durante 1 minuto para quitar el exceso de disolución orgánica. Por último, para la preconcentración de cobre se introdujo la fibra en un recipiente de polipropileno de baja densidad con 36 mL de la muestra de cobre la cual fue agitada con agitadores magnéticos (*LBX H01,2 L, Labbox Labware, S.L.*) a una velocidad fijada previamente por un tacómetro óptico (*testo 470, Testo*) (*Figura 6f*). Como se observa en la *figura 6f*, se introdujeron 3 fibras simultáneamente, obteniendo así tres réplicas internas del experimento que permiten el estudio de la desviación estándar del mismo y de la reproducibilidad de la extracción. Pasado el tiempo de preconcentración, se recuperó la disolución receptora en tubos de ensayo con ayuda de una micropipeta (*Figura 6g*). Posteriormente fue pesada con una balanza analítica de 4 cifras decimales (*Denver Instrument Company AA- 160*) y a continuación se le añadieron 2 mL de agua Milli – Q a la disolución receptora recuperada teniendo así volumen de muestra suficiente para la medida.

La concentración de cobre en la disolución receptora fue medida mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica (EAA) con llama (*ContrAA, Analytik Jena*) (*Figura 6h*), siendo la llama de aire - acetileno. Además, el equipo estaba equipado con una lámpara de arco de xenón y se midió a una longitud de onda de 324,6 nm, línea principal para este elemento.

Antes de realizar las medidas se llevó a cabo la calibración del equipo, haciéndose una recta de calibrado para la que se prepararon cinco patrones acidificados de concentraciones entre 0,1 mg/L y 2 mg/L de cobre a partir de una disolución de 100 mg/L de cobre.

3.5. Optimización del método

En este apartado se describirán las variables o factores implicados en el transporte de cobre. Dichas variables son: el pH de la muestra, la concentración del agente extractante DEHPA y la concentración de ácido nítrico en la disolución receptora.

La variable que se definió como respuesta, con objeto de maximizar su valor mediante la optimización, fue el factor de enriquecimiento (F.E.), el cual es un indicador de cuánto se

ha preconcentrado el metal después de realizar la microextracción y que viene definido por la ecuación 3.

$$F.E. = \frac{[Cu]_{receptora}}{[Cu]_{muestra}}$$

(Ecuación 3)

Donde $[Cu]_{receptora}$ es la concentración de cobre en la fase receptora después de que se produzca la preconcentración, y $[Cu]_{muestra}$ es la concentración inicial de cobre en la muestra, en este caso 0,5 mg /L.

Las condiciones hidrodinámicas se mantuvieron constantes para todos los experimentos, con un tiempo de extracción de 1 hora y una velocidad de agitación de 700 rpm.

3.5.1. Optimización multivariante simultánea

Debido a que el sistema químico se estudió con anterioridad y se conocen, por tanto, las variables o factores que intervienen, se seleccionó como método de optimización multivariante simultánea un diseño de experimentos de tipo factorial que nos permite trabajar con la metodología de superficie de respuesta (MSR), en concreto, el diseño de Box- Behnken.

El diseño se llevó a cabo mediante el uso del programa informático *Statgraphics Centurion XVI* suministrado por *Statistical Graphics Corporation (EE.UU.)*. Como se comentó previamente, la variable respuesta a estudiar fue el factor de enriquecimiento y los tres factores implicados en el estudio que se definieron fueron: pH, concentración de DEHPA y concentración de ácido nítrico.

Por otro lado, este diseño de experimentos siempre constará de tres niveles: alto, bajo y punto central (*Tabla 1*). Se asignaron los niveles superior e inferior para los tres factores de acuerdo con los conocimientos previos del sistema. Además, se tuvo en cuenta que la concentración de DEHPA no puede alcanzar valores altos debido a que la viscosidad del reactivo limita el transporte de metal hacia la disolución receptora. Los valores correspondientes al punto central fueron definidos por el programa informático como el promedio de los niveles determinados para los factores, quedando situado en el centro de estos niveles.

Tabla 1: Niveles asignados a los factores del sistema.

Factor	Nivel bajo (-1)	Punto central (0)	Nivel alto (+1)
pH	4	5,5	7
[DEHPA] / M	0,05	1,025	2
[HNO₃] / M	0,05	1,025	2

El número de experimentos resultante de un diseño experimental de Box – Behnken vendrá determinado por la ecuación 4:

$$N^{\circ} \text{ experimentos} = 2k(k - 1) + n \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde k es el número de factores en estudio y n es el número de puntos centrales que se añaden al diseño [27].

Como se puede apreciar en la tabla 2, el diseño experimental consta de 15 experimentos, los cuales se llevaron a cabo de forma aleatoria minimizando así el error sistemático. En cada experimento se realizaron tres réplicas internas teniendo así una medida de la dispersión de los datos para cada uno y pudiendo evaluar la reproducibilidad del sistema.

Tabla 2: Diseño de Box – Behnken para tres factores.

Nº experimento	pH	[DEHPA]/M	[HNO₃]/M
1	5,5	0,05	2
2	7	1,025	0,05
3	5,5	0,05	0,05
4	5,5	2	2
5	7	1,025	2
6	5,5	1,025	1,025
7	5,5	2	0,05
8	7	2	1,025
9	7	0,05	1,025
10	4	1,025	2
11	5,5	1,025	1,025
12	4	1,025	0,05
13	5,5	1,025	1,025
14	4	0,05	1,025
15	4	2	1,025

Por otro lado, se observan tres experimentos (experimentos 6, 11 y 13) que surgen de la adición de puntos centrales al diseño. De esta forma es posible verificar la curvatura del sistema debido a los efectos cuadráticos, verificar las interacciones entre los factores y obtener una estimación del error. Estos experimentos se sitúan en el centro de la esfera que delimita la región experimental.

3.5.2. Optimización multivariante secuencial

Como método para la optimización multivariante secuencial, se seleccionó el diseño simplex modificado. Debido a que se evalúan tres factores (k), la región experimental será una figura geométrica en tres dimensiones, en concreto un tetraedro centrado en el origen en cuyos vértices se sitúan los experimentos (Figura 7).

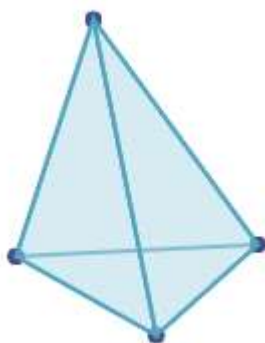


Figura 7: diseño Simplex para $k=3$ variables.

Este método permite alcanzar el valor óptimo para la variable respuesta de una forma sencilla y rápida debido a que, a diferencia del método simplex de paso fijo que sólo se desplaza mediante reflexiones, utiliza distintos tipos de desplazamientos (contracciones positivas y contracciones negativas). Esto posibilita la aproximación hacia la zona donde la respuesta es máxima con desplazamientos más cortos cuando nos encontramos en las proximidades del punto óptimo del sistema y más rápidos cuando está lejos del óptimo.

En base a los estudios previos del sistema químico realizados por el grupo de investigación, se eligieron los valores de inicio (nivel base) y el tamaño de paso para cada factor (tabla 3), a partir de los cuales se generó el simplex inicial.

Tabla 3: Nivel base y tamaño de paso para los factores en estudio.

Factor	Nivel base	Tamaño de paso
pH	5	2
[DEHPA] / M	1	1
[HNO₃] / M	0,5	1

La selección del simplex inicial (vértices 1 – 4) fue llevado a cabo por el programa informático *Simplex Modificado* basado en el algoritmo creado por C. K. Bayne y desarrollado por el profesor de la Universidad de Cádiz, Juan Antonio Poce Fatou [32]. En la *tabla 4*, se muestran los cuatro experimentos que constituyen el tetraedro inicial y a partir de los cuales se comenzará la optimización del sistema.

Tabla 4: *Simplex inicial*

Vértice	pH	[DEHPA]/M	[HNO₃]/M
1	5	1	0,5
2	5	1	1,5
3	6,7	1	1
4	5,6	1,8	1

Los vértices posteriores fueron evaluados teniendo en cuenta los valores máximos alcanzados de la variable respuesta, factor de enriquecimiento (F.E.), siendo el criterio utilizado para parar el simplex la comparación entre la varianza de cada simplex y la varianza del método. Cuando la varianza del método es mayor que la varianza del conjunto de experimentos que conforman el simplex (4 experimentos), se considera que la variación es debido al error aleatorio. Para calcular la varianza del método se realizaron cuatro réplicas del experimento número 1.

4. Resultados y discusión

En este apartado se presentarán los resultados obtenidos para la optimización multivariante simultánea y la optimización multivariante secuencial, así como una discusión de los resultados obtenidos para cada método.

4.1. Diseño Box- Behnken

Como se ha comentado en el desarrollo experimental, se realizó un diseño de experimentos basado en la metodología de superficies de respuesta (MSR) para la optimización multivariante simultánea de las variables del método. Este método proporciona las condiciones experimentales de todos los experimentos con anterioridad a la ejecución de los mismos, sin que dependa ninguno de ellos del valor obtenido. Como se comentó previamente, se definió como variable respuesta el factor de enriquecimiento (F.E.) y se seleccionaron las tres variables o factores a estudiar: pH, [DEHPA] y [HNO₃]. En la *tabla 5* se presentan: la matriz del diseño con las variables codificadas según estén en su nivel alto (+), bajo (-) o punto central (0), el valor de la variable respuesta (F. E.) para cada experimento y la desviación estándar (SD).

Tabla 5: Matriz de diseño, respuesta y desviación para el diseño de experimentos Box- Behnken

Nº experimento	pH	[DEHPA]	[HNO ₃]	F.E.	SD
1	0	-	+	0	0,08
2	+	0	-	0	0,03
3	0	-	-	12,98	1,42
4	0	+	+	24,20	1,30
5	+	0	+	9,73	0,68
6	0	0	0	37,20	0,75
7	0	+	-	0	0,08
8	+	+	0	11,13	0,60
9	+	-	0	0	0,01
10	-	0	+	27,64	3,13
11	0	0	0	39,22	1,07
12	-	0	-	38,98	6,30
13	0	0	0	47,38	4,33
14	-	-	0	7,68	3,70
15	-	+	0	34,24	2,34

Se puede observar como los experimentos para los que se obtiene un mayor factor de enriquecimiento son aquellos que pertenecen a los puntos centrales del diseño, siendo el valor medio de la respuesta $41,27 \pm 5,39$.

Una vez obtenidos los valores de factor de enriquecimiento para cada experimento, se procedió a ver la influencia estadística que tienen los efectos de las variables e interacciones cuadráticas y no cuadráticas sobre la respuesta. Para ello se realizó un estudio del análisis normal de la varianza (ANOVA) cuyos datos se recogen en la *tabla 6*.

Tabla 6: Tabla Análisis de la Varianza (ANOVA)

Variable	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F	p - valor
pH	960,89	1	960,89	19,12	0,0072
[DEHPA]	299,03	1	299,03	5,95	0,0587
[HNO₃]	11,57	1	11,57	0,23	0,6517
pH – pH	306,22	1	306,22	6,09	0,0566
pH – [DEHPA]	59,54	1	59,54	1,18	0,3261
pH – [HNO₃]	111,00	1	111,00	2,21	0,1974
[DEHPA] – [DEHPA]	1318,97	1	1318,97	26,24	0,0037
[DEHPA] – [HNO₃]	345,58	1	345,58	6,88	0,0470
[HNO₃] - [HNO₃]	630,89	1	630,89	12,55	0,0165
Error total	251,28	5	50,26		
Total correlación	4032,99	14			

La tabla ANOVA permite identificar qué variables tienen una influencia estadísticamente significativa sobre la respuesta a un nivel de confianza determinado. Para este caso se seleccionó un nivel de confianza del 95%. Para ello, observamos el valor del p – valor de cada variable o de las interacciones entre las mismas. Aquellos casos en los que su valor sea menor a 0,05 nos indican que la probabilidad de que la respuesta sea independiente de los factores es menor al 5%. Si esto ocurre, se rechaza la hipótesis de independencia demostrándose que existe relación entre la variable respuesta y el factor estudiado.

Atendiendo a los valores de p – valor, observamos que tanto el pH, la interacción [DEHPA] - [DEHPA], la interacción [DEHPA] – [HNO₃] y la interacción [HNO₃] - [HNO₃] presentan diferencias estadísticamente significativas, influyendo en la variable de respuesta.

Otro dato que podemos obtener del análisis de la varianza es el ajuste del modelo matemático cuadrático a partir de los datos experimentales, siendo la bondad del ajuste de un 93,79 %. Este dato explica en más de un 90% la variabilidad en el factor respuesta,

prediciendo el valor del factor de enriquecimiento para diferentes valores de las variables de estudio.

A continuación se llevó a cabo el estudio de los efectos estimados para el factor de enriquecimiento, es decir, el estudio de los efectos de las variables que más influyen a la variable respuesta, recogiendo los valores en la siguiente tabla:

Tabla 7: Efectos estimados para F.E.

Variable	Efecto estimado	Error de muestreo
pH	-21,92	5,01
[DEHPA]	12,23	5,01
[HNO ₃]	2,40	5,01
pH - pH	-18,21	7,38
pH - [DEHPA]	-7,72	7,09
pH - [HNO ₃]	10,54	7,09
[DEHPA] - [DEHPA]	-37,80	7,38
[DEHPA] - [HNO ₃]	18,59	7,09
[HNO ₃] - [HNO ₃]	-26,14	7,38

La *tabla 7* muestra información de los efectos principales, los efectos de las interacciones entre un mismo factor y los efectos de las interacciones entre factores sobre la respuesta así como su error estándar, el cual mide el error de muestreo. La magnitud y el signo de estos efectos proporcionan información sobre cómo afectan a la respuesta de interés. Aquellos efectos que tengan signo negativo sugieren que, al incrementar el nivel del factor desde el nivel bajo al alto, se reducirá el valor de la variable respuesta. Por otro lado, los efectos que tengan signo positivo sugieren que, al incrementar el nivel del factor desde su nivel bajo hasta el alto, aumentará el valor de la variable respuesta.

Atendiendo a la *tabla 7* podemos observar como la interacción [DEHPA] – [DEHPA] es la que más influye sobre la respuesta, disminuyendo el factor de enriquecimiento al incrementar la concentración de DEHPA. Por tanto, se obtendrán mejores factores de enriquecimiento a concentraciones bajas del mismo.

Por otro lado, atendiendo a los valores absolutos de los efectos se observa como la interacción [HNO₃] - [HNO₃], la interacción [DEHPA] - [HNO₃] y el pH tienen un gran efecto sobre la respuesta.

Esto se puede apreciar también de forma gráfica en el diagrama de Pareto (Figura 8), donde se grafica en orden decreciente de importancia los efectos estimados estandarizados.

La estandarización de los efectos estimados resulta del cociente entre el efecto estimado y su error de muestreo proporcionando la ventaja de trabajar con magnitudes adimensionales que permiten ajustar dichos valores a un gráfico de barras ordenado de mayor a menor influencia.

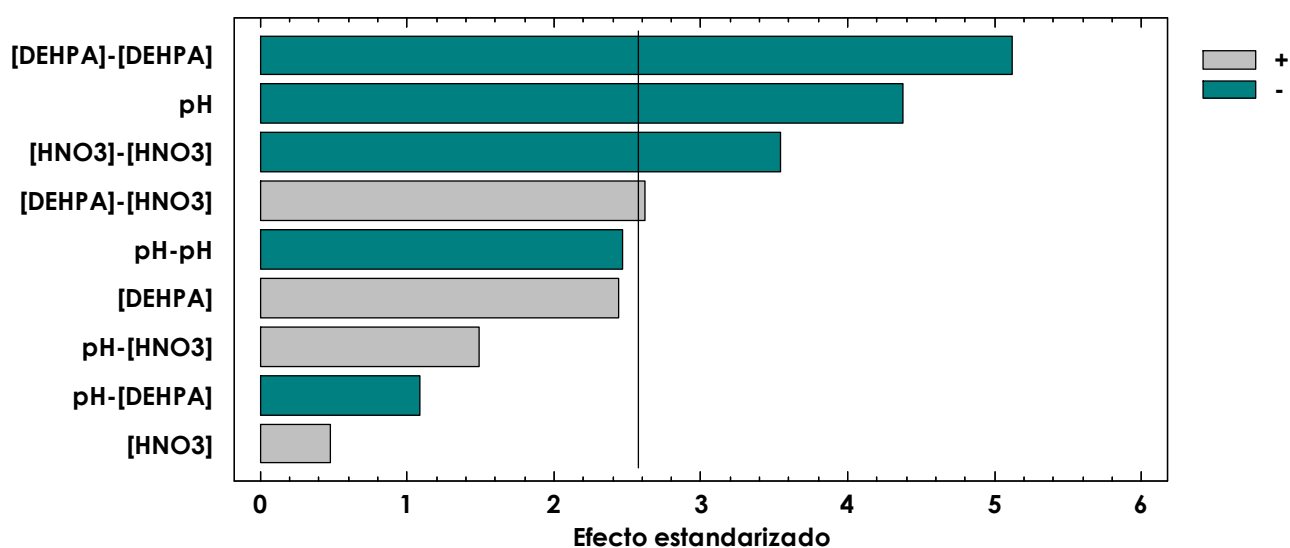


Figura 8: Diagrama de Pareto

Este gráfico indica un valor de referencia a partir del cual los efectos son estadísticamente significativos, siendo en este caso el valor 2,60. Es decir, los efectos estandarizados que alcancen este valor tendrán una influencia significativa sobre la respuesta a un nivel de confianza del 95%.

Este diagrama confirma de una manera rápida lo que se ha expuesto con anterioridad. Existen diferencias significativas entre la interacción cuadrática de [DEHPA], la interacción cuadrática de [HNO₃], la interacción [DEHPA] - [HNO₃] y el pH. Por lo tanto, habrá dependencia entre el factor de enriquecimiento y estos factores. Además, los signos correspondientes a los efectos para cada factor indican en qué dirección se produce un aumento en la respuesta, indicándonos los signos positivos que la respuesta aumentará cuando las variables adopten valores que se encuentren en la región desde el punto central al nivel superior e indicándonos los signos negativos que la respuesta aumentará cuando las

variables adopten valores que se encuentren en la región desde el punto central al nivel inferior.

Atendiendo al diagrama de Pareto se observa que el efecto estandarizado de la interacción cuadrática de la concentración de DEHPA tiene signo negativo, es decir, que la respuesta del sistema aumentará en la región en la que la concentración va desde el mínimo establecido hasta el punto central. Cuando aumentamos la concentración desde el punto central hasta el valor máximo, el factor de enriquecimiento disminuirá debido a que, al aumentar la concentración de extractante aumentará también la viscosidad de la disolución orgánica, limitando así el transporte de cobre desde la muestra hasta la disolución receptora y por tanto, la preconcentración del mismo.

Por otro lado, atendiendo al signo del efecto estandarizado del pH se observa como el valor de la variable respuesta en este caso aumentará cuando los valores de pH se encuentren en la región desde el mínimo hasta el punto central, es decir, el factor de enriquecimiento aumentará a pH bajos. Aunque el pH sea ácido habrá gradiente suficiente para que se lleve a cabo el contratransporte de protones. A pH altos aunque existe una mayor diferencia entre la concentración de protones entre la muestra y la disolución receptora, el factor de enriquecimiento disminuirá. Esto puede ser debido a la presencia de NaOH para ajustar el pH de la muestra. El cobre a pH básico y en presencia de una sal, puede formar un compuesto que precipite, en este caso $\text{Cu}(\text{OH})_2$. De esta forma la concentración de cobre libre presente en la muestra disminuye y consecuentemente la microextracción del mismo también, lo que explicaría la disminución de la respuesta en este caso.

Por otro lado, atendiendo al diagrama de Pareto se observa como el efecto de la interacción cuadrática de la concentración de HNO_3 tiene signo negativo. Esto significa que los mayores factores de enriquecimiento los obtendremos en la región en la que la concentración de HNO_3 adopta valores entre el valor mínimo y el punto central. Esto es debido a que a concentraciones altas de HNO_3 el ácido puede degradar al extractante, por lo que quedaría también limitado el transporte de cobre al no poder formar el complejo.

Por último, el análisis del efecto de la interacción $[\text{DEHPA}] - [\text{HNO}_3]$. Como se comentó con anterioridad el mecanismo de transporte por el que se lleva a cabo la microextracción del cobre es el contratransporte acoplado, en concreto el contratransporte de protones. En este mecanismo de transporte, tendrá lugar una reacción de intercambio iónico entre el cobre y el DEHPA formándose así el complejo Cu – DEHPA. Para que el cobre libre quede en la disolución receptora es necesario que se produzca la reacción inversa, por lo que el HNO_3

aportará dos protones al DEHPA de forma que éste se regenere. Eso explica que la interacción entre DEHPA y HNO_3 sea significativa ya que las concentraciones de ambos compuestos están relacionadas en el mecanismo de transporte del metal.

Una vez vistas las variables e interacciones que tienen una influencia significativa sobre la respuesta, se estudiaron las interacciones entre variables cuando se encuentran en sus niveles altos (+) y bajos (-) mediante un gráfico de interacciones (figura 9).

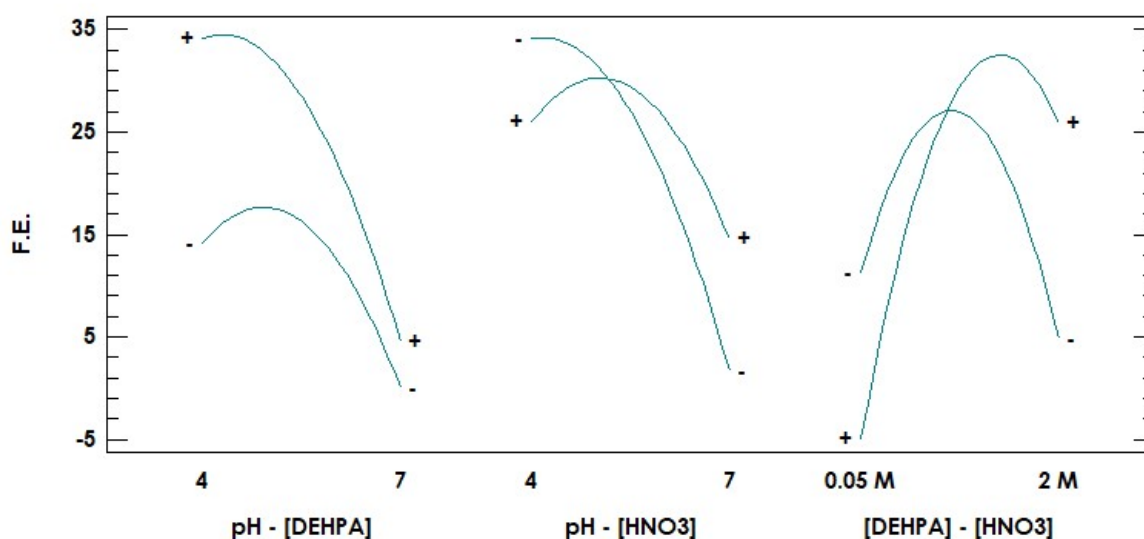


Figura 9: Gráfico de interacciones para F.E.

En la figura 9 se presentan las interacciones pH – [DEHPA], pH – $[\text{HNO}_3]$ y $[\text{DEHPA}] - [\text{HNO}_3]$. Los valores que se recogen en el eje X corresponden al primer factor de la interacción, es decir, en los dos primeros casos al pH y en el último caso a [DEHPA]. Los símbolos “+” y “-” corresponden a los niveles alto y bajo del segundo factor de la interacción, siendo estos [DEHPA] y para los dos últimos casos $[\text{HNO}_3]$.

De una forma rápida se puede apreciar entre qué factores existe interacción debido al cruce de las líneas. En el caso de la interacción pH – [DEHPA] se observa como las líneas no se cruzan por lo que no existirá interacción entre ambos. Por otro lado, para los casos de las interacciones pH - $[\text{HNO}_3]$ y $[\text{DEHPA}] - [\text{HNO}_3]$ al existir cruce entre las líneas hay interacción entre dichos efectos.

En el estudio de la interacción pH – [DEHPA], se observa cómo se obtienen mayores factores de enriquecimiento para pH bajos y altas concentraciones de DEHPA. A medida que el pH aumenta, la respuesta disminuye alcanzando el valor mínimo para un nivel bajo de DEHPA y un nivel alto de pH. En general, se consiguen mayores factores de enriquecimiento a

pH bajo, consiguiéndose la extracción máxima a $\text{pH} = 4$ y $[\text{DEHPA}] = 2 \text{ M}$. Esto se explica debido a que para que haya transporte de cobre tiene que existir una diferencia entre la concentración de protones de la muestra y el ácido que se encuentra en la disolución receptora (HNO_3). A pH altos, como se ha comentado con anterioridad, es posible que el cobre libre precipite en forma de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ y a pH bajo deberá existir gradiente suficiente para que tenga lugar el contratransporte de protones desde la disolución receptora hasta la muestra. Al aumentar la concentración de DEHPA aumentará también el factor de enriquecimiento debido a que hay más moléculas del extractante disponibles para reaccionar con el cobre. No obstante, cuando la concentración del extractante DEHPA es muy alta, este efecto positivo se ve reducido debido a que la difusión del metal es más lenta al aumentar la viscosidad, quedando por tanto limitado el transporte de cobre.

En el caso de la interacción $\text{pH} - [\text{HNO}_3]$ vemos que el máximo factor de enriquecimiento se consigue para el nivel bajo de pH y el nivel bajo de $[\text{HNO}_3]$. Cuando vamos aumentando el pH, el factor de enriquecimiento va disminuyendo, siendo el valor mínimo para un nivel bajo de $[\text{HNO}_3]$ y un nivel alto de pH. En general se consigue una mayor respuesta a niveles bajos de pH, siendo la máxima respuesta para $\text{pH} = 4$ y $[\text{HNO}_3] = 0,05 \text{ M}$. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que a pH bajos ya existe gradiente suficiente como para que se produzca el contratransporte de protones. Por otro lado, y teniendo en cuenta la concentración de HNO_3 , altas concentraciones del ácido pueden degradar al extractante por lo que a bajas concentraciones se obtendrán mejores resultados.

Por último, se estudian las interacciones $[\text{DEHPA}] - [\text{HNO}_3]$. Para un nivel bajo de concentración de HNO_3 , la respuesta va aumentando con el aumento de la concentración de DEHPA cayendo a partir de un máximo obtenido alrededor del punto central. Por otro lado, para una concentración de HNO_3 en el nivel alto, la respuesta aumenta con el aumento de la concentración de DEHPA, alcanzándose el valor máximo del F.E. alrededor del punto central a partir del cual empieza a caer posiblemente por la viscosidad del extractante.

Una vez que se han visto todas las posibles interacciones existentes en el sistema, se presenta la ecuación del modelo (ecuación 5):

$$\begin{aligned} \text{F.E.} = & -68,30 + 36,23\text{pH} + 51,52[\text{DEHPA}] - 0,41[\text{HNO}_3] - 4,05\text{pH}^2 - 2,64\text{pH} \cdot [\text{DEHPA}] + 3,60\text{pH} \cdot [\text{HNO}_3] \\ & - 19,88[\text{DEHPA}]^2 + 9,78[\text{DEHPA}] \cdot [\text{HNO}_3] - 13,75[\text{HNO}_3]^2 \end{aligned}$$

Atendiendo a los valores del p – valor observados en la tabla ANOVA (*tabla 6*) se podrán eliminar de la ecuación aquellos términos que no son estadísticamente significativos simplificándose así la ecuación del modelo para el cálculo del factor de enriquecimiento (*ecuación 6*).

$$F.E. = -68,30 + 36,23pH - 19,88[DEHPA]^2 + 9,78[DEHPA] \cdot [HNO_3] - 13,75[HNO_3]^2$$

Para obtener una estimación de los valores óptimos del sistema que permitan obtener un valor máximo del factor de enriquecimiento de una forma sencilla, se pueden representar en tres dimensiones los datos obtenidos frente a los diferentes niveles para las variables, obteniéndose así una gráfica de superficie de respuesta (*figura 10*).

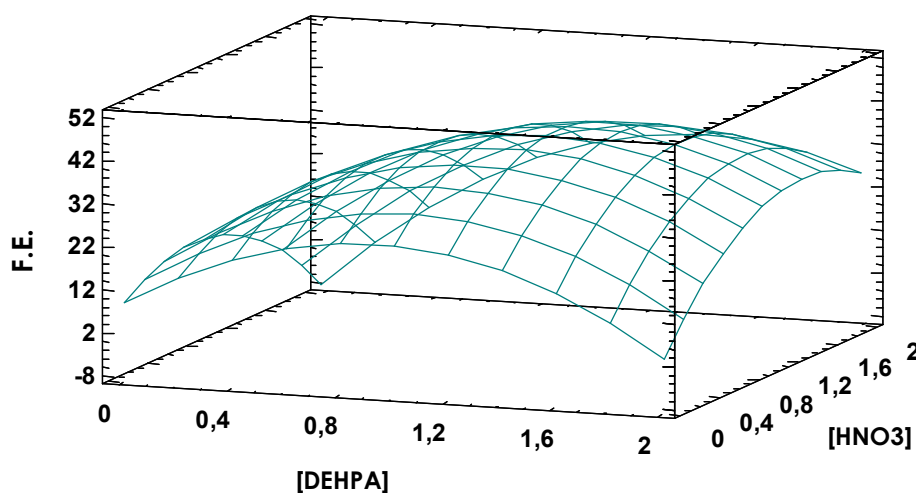


Figura 10: Gráfico de superficie de respuesta estimada a pH = 5,5.

Por ejemplo, en la *figura 10* se muestra cómo varían los valores del F. E. según cambian los valores de la concentración de DEHPA y la concentración de HNO₃ manteniendo fijo el pH a un valor de 5,5.

Por último, calculando el vector gradiente de la función, o lo que es lo mismo, realizando las derivadas parciales e igualándolas a cero, obtenemos el máximo de la función, obteniendo por tanto las condiciones óptimas para la máxima preconcentración de cobre. Los valores óptimos resultantes fueron: pH = 4,5; [DEHPA] = 1,03 M y [HNO₃] = 1,02 M. Sustituyendo estos valores en la ecuación del modelo se obtiene un F. E. = 44,49.

No obstante, se realizó un experimento en las condiciones optimizadas y el factor de enriquecimiento final obtenido fue de 38,4, ligeramente inferior al predicho por el modelo. A pesar de ello, el sistema optimizado permite una mayor preconcentración que el de membranas de volumen en el que se basa, ya que en este caso el sistema permitía un factor de preconcentración de sólo 4,30 [14].

4.2. Método Simplex

Para la optimización multivariante secuencial, como se explicó previamente, se utilizó el método simplex modificado. A partir del simplex inicial se han evaluado los vértices con la ayuda del programa informático *Simplex Modificado* así como las respuestas obtenidas para el factor de enriquecimiento, generándose así nuevos simplex (tabla 8). Por otro lado, en la tabla 8 también se recogen los datos del tipo de desplazamiento que realizó el simplex, desviación estándar de cada experimento, varianza de cada simplex y valores de F.

Tabla 8: Resultados obtenidos por el método simplex modificado.

Vértice	Tipo	pH	[DEHPA]/M	[HNO ₃]/M	F.E.	S D	SÍMPLEX	S ² _{simplex}	F
1	I	5,0	1,0	0,5	63,17	3,29			
2	I	5,0	1,0	1,5	38,16	3,93			
3	I	6,7	1,0	1,0	19,08	1,13			
4	I	5,6	1,8	1,0	15,09	1,20	1-2-3-4	482,86	23,32
5	R	5,6	0,2	1,0	6,94	1,95	1-2-3-5	601,49	29,05
6	C-	5,6	1,4	1,0	27,66	2,96	1-2-3-6	364,97	17,63
7	C+	3,7	1,3	1,0	22,57	0,13	1-2-6-7	326,19	15,75
8	C-	4,4	1,2	1,0	38,41	6,07	1-2-6-8	227,16	10,97
9	R	4,0	0,7	1,0	30,14	2,68	1-2-8-9	205,27	9,91
10	C-	4,4	0,9	1,0	34,09	2,26	1-2-8-10	176,68	8,53
11	C-	4,0	0,95	0,2	57,96	7,37	1-8-9-11	246,37	11,90
12	C+	4,9	1,4	0,1	36,19	1,93	1-8-11-12	185,79	8,97
13	C-	4,7	1,2	0,3	48,11	2,25	1-8-11-13	120,05	5,80
14	C+	4,7	0,9	0,3	56,30	5,88	1-11-13-14	39,04	1,89
15	C+	4,4	0,7	0,1	59,78	6,71	1-11-14-15	8,67	0,42

En la columna *tipo* se ha indicado qué tipo de desplazamiento ha adoptado el *simplex* correspondiendo la letra *I* al *simplex* inicial, *R* a un movimiento de reflexión, *C-* a una contracción negativa y *C+* a una contracción positiva.

Por otro lado, en la columna *SÍMPLEX* se ha indicado qué experimentos forman el *simplex*, tachando en rojo el experimento que se elimina en cada caso, generalmente el de peor respuesta. Por ejemplo, el *simplex* inicial lo forman los experimentos 1 – 2 – 3 – 4. Una vez se evalúan las respuestas, se observa que el experimento con el que hemos obtenido un menor factor de enriquecimiento es el experimento 4, por lo que se elimina ese experimento (vértice del tetraedro) y a partir de una reflexión se genera un experimento nuevo con nuevas condiciones. De esta forma, el nuevo *simplex* obtenido lo formarán los vértices 1 – 2 – 3 – 5. Así se irán evaluando los experimentos secuencialmente. En el caso de que un nuevo experimento dé la peor respuesta por segunda vez consecutiva, el *simplex* se considera no eficaz. Esto es lo que ocurre en el *simplex* número 10 compuesto por los vértices 1 – 2 – 8 – 10, al dar la peor respuesta por segunda vez se retrocede un paso, eliminando el segundo peor valor en el *simplex* anterior, en este caso el vértice número 2 y conservando el peor, que en este caso fue el 9. De esta forma se evitará alejarse del óptimo.

Para parar el *simplex* se realizó una comparación entre el valor de *F* tabulado para una probabilidad $p = 0,67$ y el valor de *F* calculado. El valor de *F* tabulado para una probabilidad $p = 0,67$ es en este caso 1,72. Por otro lado, *F* calculado es el cociente entre la varianza de cada *simplex* y la varianza del método, teniendo esta última un valor de 20,7.

Como se observa en la *tabla 8*, el *simplex* se detuvo después de 15 experimentos, ya que al no haber diferencias significativas entre el valor de *F* calculada y *F* tabulada se considera que la dispersión en los valores obtenidos en los experimentos es debido al error aleatorio.

Representando los valores obtenidos para el factor de enriquecimiento frente al número de experimentos, se obtiene una visión clara de qué experimento ha proporcionado un mayor factor de enriquecimiento (*Figura 11*). Los valores que adopten las variables en ese experimento serán las condiciones óptimas del sistema.

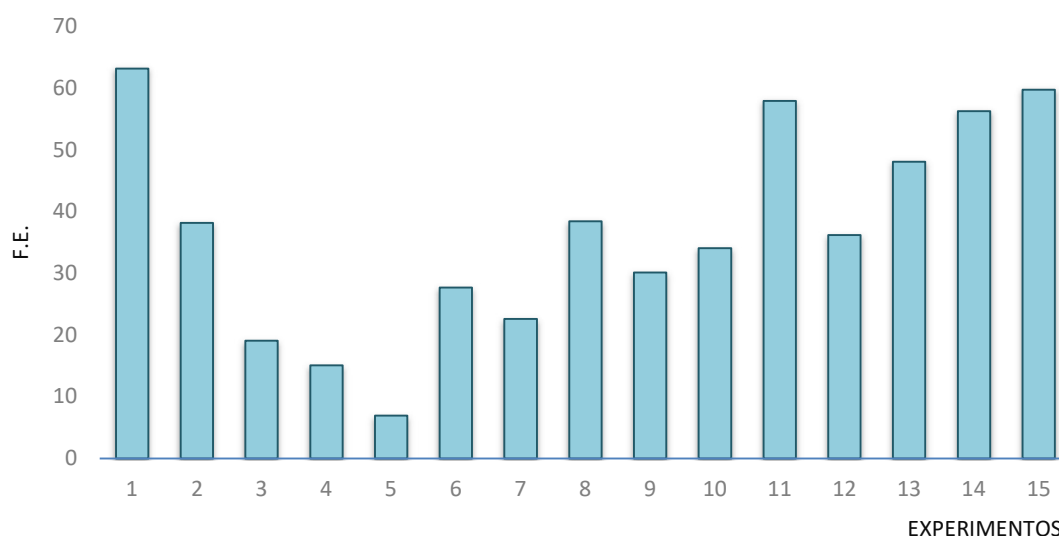


Figura 11: Gráfico de barras para el factor de enriquecimiento.

Como muestra tanto la *tabla 8* como la *figura 11*, el experimento con el que se obtuvo una mayor respuesta fue el experimento 1. Para dicho experimento se obtuvo un factor de enriquecimiento de $63,17 \pm 3,29$, bastante superior al obtenido con la optimización basada en un diseño de Box-Behnken. Teniendo en cuenta este experimento, los valores de las variables químicas optimizadas corresponden a $\text{pH} = 5$, $[\text{DEHPA}] = 1 \text{ M}$ y $[\text{HNO}_3] = 0,5 \text{ M}$.

5. Comparación Box – Behnken y Símples modificado

En este apartado se muestra una comparación entre los dos métodos de optimización utilizados durante la realización del trabajo, considerando las ventajas y desventajas que tiene cada uno.

Por un lado, como se ha comentado anteriormente, el diseño de Box – Behnken es un diseño que pertenece a la metodología de superficie de respuestas, lo que nos permite obtener una ecuación matemática que nos describe el modelo en su totalidad, permitiéndonos interpolar dentro del rango de valores que describen la superficie. Esto no es posible con el método símples debido a que el método no nos proporciona una ecuación del modelo.

Por otro lado, en el diseño de Box – Behnken debido a la existencia de puntos centrales en el diseño tenemos un modelo de segundo orden que nos permite obtener una estimación de la curvatura del sistema derivada de las interacciones cuadráticas y no cuadráticas entre variables. Además la existencia de estos puntos centrales también nos permite obtener una

estimación del error aleatorio del sistema. El método *simplex* es un método que también pertenece a la metodología de superficie de respuesta, pero en este caso de primer orden, por lo que no se podrá obtener información sobre las interacciones de las variables ni sobre el error.

El diseño de experimentos Box – Behnken nos permite obtener una gran cantidad de información de forma gráfica, lo que nos resulta en una rápida y clara interpretación de resultados. El método *simplex* no nos proporciona esta información.

El diseño de Box – Behnken nos permite hacer un estudio estadístico de significancia de los datos mediante el análisis normal de la varianza (ANOVA). En el método *simplex* para poder obtener la varianza del método será necesario replicar un experimento.

En cuanto al gasto de reactivos, en la experimentación realizada con el diseño Box – Behnken debido a que es un método de optimización multivariante simultánea y que los niveles de las variables son fijos, el volumen de reactivos utilizados es menor, debido a que sólo se preparan disoluciones con dichos valores de concentración. En cambio, al ser el método *simplex* secuencial y tener que evaluar los resultados para calcular nuevos *simplex*, se tendrán que preparar más disoluciones con nuevos valores de concentración consumiendo así un mayor volumen de reactivos. Además, en el diseño Box – Behnken se saben cuántos experimentos conforman el diseño, mientras que en el método *simplex* no, ya que hay que evaluar constantemente la respuesta para saber si se cumple el criterio para pararlo.

No obstante, ambos métodos nos permiten optimizar el sistema de una forma rápida y simple. Aunque el *simplex* no nos dé información sobre las interacciones entre variables, nos permite alcanzar el óptimo del sistema de una forma directa pudiendo utilizarse para la optimización multivariante en el caso que tengamos pocas variables de estudio o que tengamos información de qué variables tienen mayor influencia sobre el sistema. Además, en este método no es necesario tener que realizar un test F para ver la significancia de los datos, ya que mediante las reflexiones y contracciones se irá moviendo hacia el óptimo.

Comparando los resultados obtenidos para ambos métodos de optimización multivariante, se observa que las variables optimizadas en ambos casos adoptan valores similares, con la excepción de la concentración de ácido nítrico en la disolución receptora que fue inferior en el caso de la optimización *simplex*, pudiendo considerarse que ambos métodos son eficientes para la optimización (*tabla 9*).

Tabla 9: Valores optimizados de los factores estudiados para ambos métodos de optimización

Factor	Box - Behnken	Símplex Modificado
pH	4,5	5,0
[DEHPA] / M	1,03	1,0
[HNO₃] / M	1,02	0,5

Finalmente, hay que señalar que a pesar de que ambos métodos han resultado buenos para optimizar el sistema, el factor de enriquecimiento obtenido con el método símplex (63,17) es muy superior al obtenido experimentalmente con el método Box-Behnken (38,4), posiblemente relacionado con la menor concentración de ácido nítrico utilizada en la disolución receptora que evitaría la degradación de la disolución orgánica además de mantener un mayor gradiente de protones entre las dos disoluciones acuosas favoreciendo el transporte.

6. Conclusiones

Una vez se ha finalizado la experimentación podemos obtener las siguientes conclusiones:

Es posible optimizar las condiciones químicas para un sistema de preconcentración de cobre mediante técnicas de optimización multivariante utilizando un método de microextracción en fase líquida que implica el empleo de capilares de fibra hueca (HF – LPME).

En base a los resultados obtenidos se considera que tanto el método de optimización multivariante simultáneo que implica un diseño de Box – Behnken como el método multivariante secuencial que implica al método Símplex modificado son aptos para alcanzar los valores óptimos de las variables implicadas en el método de microextracción propuesto de una forma rápida y eficaz.

El método de optimización más adecuado para este sistema, debido a las interacciones que se producen entre factores, es el diseño de experimentos de Box – Behnken ya que proporciona información mediante un modelo matemático que tiene en cuenta la curvatura del sistema debido a las interacciones. Además proporciona información de qué interacciones son estadísticamente significativas mediante el estudio de la tabla ANOVA aportando así información del comportamiento químico del sistema.

Si solo se busca la optimización del sistema de estudio será suficiente un sistema de optimización multivariante como el Símplex modificado, sin embargo, si se quiere profundizar en el conocimiento del sistema y conocer las variables más influyentes sólo el diseño de experimentos proporciona dicha información, siendo esto especialmente útil cuando existen muchas variables de estudio.

7. Bibliografía

- [1]. «Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas», *Diario Oficial no. L 327 de 22/12/2000*, pp. 0001 – 0073, 23 octubre 2000.
- [2]. C. Orozco Barrenetxea, A. Pérez Serrano, M. N. González Delgado, F. J. Rodríguez Vidal y J. M. Alfayate Blanco. *Contaminación Ambiental: Una visión desde la química*, Paraninfo, 2011.
- [3]. Unesco, “ *Agua para todos, agua para la vida. Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo*”, 2003.
- [4]. S. E. Manahan. *Introducción a la química ambiental*, Reverté, 2007.
- [5]. P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla y D. J. Sutton, “Heavy Metals Toxicity and the Environment”, *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum*. Springer, Basel, vol. 101, pp. 133-164, 2012.
- [6]. C. Cámara y C. Pérez – Conde. *Análisis químico de trazas*, Síntesis, 2011.
- [7]. S. S. Rivas, “Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón”, Tesis doctoral. Dpto Química Analítica, Nutrición y Bromatología, USC, Santiago de Compostela, 2007.
- [8]. L. Fu, X. Lu, K. Niu, J. Tan y J. Chen, “Bioaccumulation and human health implications of essential and toxic metals in freshwater products of Northeast China”, *Science of The Total Environment*, vol. 673, pp. 768-776, 2019.
- [9]. M. Shorie, H. Kaur, G. Chadha, K. Singh y P. Sabherwal, “Graphitic carbon nitride QDs impregnated biocompatible agarose cartridge for removal of heavy metals from contaminated water samples”, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 367, pp. 629-638, 2019.
- [10]. P. Halkare, N. Punjabi, J. Wangchuk, A. Nair, K. Kondabagil y S. Mukherji, “Bacteria functionalized gold nanoparticle matrix based fiber - optic sensor for monitoring heavy metal pollution in water”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 281, pp. 643-651, 2019

- [11]. O. I. Okogwu, G. N. Nwonumara y F. A. Okoh, "Evaluating Heavy Metals Pollution and Exposure Risk Through the Consumption of Four Commercially Important Fish Species and Water from Cross River Ecosystem, Nigeria", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 102, no. 6, pp. 867-872, 2019.
- [12]. Y. C. Reyes, I. Vergara, O. E. Torres, M. Díaz y E. E. González, "Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria", *Ingeniería Investigación y Desarrollo: 12 + D*, vol. 16, no. 2, pp. 66-77, 2016.
- [13]. J. A. López-López, M. García-Vargas y C. Moreno, "A new analytical method for selective pre - concentration of free silver in estuarine waters using liquid membranes", *Talanta*, vol. 108, pp. 7-10, 2013.
- [14]. C. Mendiguchía, C. Moreno y M. García-Vargas, "Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system", *Analytica Chimica Acta*, vol. 460, no.1, pp. 35-40, 2002.
- [15]. J. A. López-López, C. Mendiguchía, J. J. Pinto y C. Moreno, "Liquid membranes for quantification and speciation of trace metals in natural waters", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 29, no. 7, pp. 645 - 653, 2010.
- [16]. J. Higdon, Linus Pauling Institute, Oregon State University, "Centro de información de micronutrientes, cobre", abril 2003. Disponible electrónicamente en: <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/minerales/cobre#referencia4>. [Último acceso: 29 septiembre 2019].
- [17]. C. Aliaga Taberner, "Composición nutritiva del pulpo (*Octopus vulgaris*) alimentado con piensos formulados con fuentes proteicas vegetales y animales", Trabajo Fin de Máster, Universidad de Valencia, 2019.
- [18]. A. Sarafraz-Yazdi y A. Amiri, "Liquid - phase microextraction", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 29, no.1, pp. 1-14, 2010.

- [19]. J. Lee, H. Kee Lee, K. E. Rasmussen y S. Pedersen-Bjergaard, "Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review", *Analytica Chimica Acta*, vol. 624, no. 2, pp. 253-268, 2008.
- [20]. V. Sharifi, A. Abbasi y A. Nosrati, "Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology", *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 24, no. 2, pp. 264-276, 2016.
- [21]. M. Ghambarian, Y. Yamini y A. Esrafil, "Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications", *Microchimica Acta*, vol. 177, no. 3-4, pp. 271-294, 2012.
- [22]. Y. Yamini, M. Rezazadeh y S. Seidi, "Liquid-phase microextraction–The different principles and configurations", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 112, pp. 264-272, 2019.
- [23]. V. Sharifi, A. Abbasi y A. & Nosrati, "Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology", *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 24, no. 2, pp. 264-276, 2016.
- [24]. M. A. Bezerra, Q. O. dos Santos, A. G. Santos, C. G. Novaes, S. L. C. Ferreira y V. S. de Souza, "Simplex optimization: a tutorial approach and recent applications in analytical chemistry", *Microchemical Journal*, vol. 124, pp. 45-54, 2016.
- [25]. E. D. Morgan. *Chemometrics: experimental design*, John Wiley & Son Ltd., 1995.
- [26]. D. C. Montgomery. *Diseño y análisis de experimentos*, México, Ed. Limusa, 2008.
- [27]. S. C. Ferreira, R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brandao y W. N. L. Dos Santos, "Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods", *Analytica Chimica Acta*, vol. 597, no. 2, pp. 179-186, 2007.
- [28]. A. Siqueiros, "Aplicación de la metodología de superficies de respuesta para el mejoramiento de la calidad del aceite de soya", Título para la obtención del título de Licenciado en Matemáticas, Sonora, Universidad de Sonora, 2004.
- [29]. G. E. Box, J. S. Hunter y W. G. Hunter. *Estadística para investigadores*, Reverté, 2008.

[30]. F. H. Walters. *Sequential simplex optimization: a technique for improving quality and productivity in research, development, and manufacturing*, CRC, 1991.

[31]. C. Vergel, R. Montoya, C. Mendiguchía, M. García-Vargas y C. Moreno, "HF-LPME as a green alternative for the preconcentration of nickel in natural waters", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 404, no. 3, pp. 665-670, 2012.

[32]. C. K. Bayne y I. B. Rubin. *Practical Experimental Designs and Optimization Methods for Chemists*, VCH Publishers, 1986.